

# Método de difusión lumínica aplicado a la capacidad inhibitoria para epitopes ABO en *Ascaris lumbricoides*\*

► Patricia Ponce de León<sup>1</sup>, Patricia Foresto<sup>2</sup>, Juana Valverde<sup>2</sup>

- 
1. Bioquímica.
  2. Doctora en Bioquímica,

\* Laboratorio de Parasitología. Laboratorio de Inmunohematología y Hemorreología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. 2000 Rosario (Argentina).

## Resumen

Experiencias previas demostraron la presencia de epitopes ABO en *Ascaris lumbricoides*. El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad inhibitoria del parásito para estos epitopes por cuantificación de la hemaglutinación aplicando el método de difusión lumínica por partículas en suspensión. Se seleccionaron 8 extractos parasitarios (EA) de pacientes grupo sanguíneo B y 4 de grupo A (con y sin epitopes ABO). Los EA fueron enfrentados a diluciones de antisuero monoclonal (anti A o anti B) y el antisuero excedente fue neutralizado con eritrocitos de isogrupo. Se midió la extinción óptica de la aglutinación resultante. Se graficó el porcentaje de aglutinación en función de la dilución del antisuero para calcular Título-50 (T-50). Se definió Poder Inhibitorio (PI) como la relación entre el T-50 del EA estudiado y el T-50 de un EA control. Se determinó la concentración proteica del extracto para expresar PI/ gramo de proteína. Los valores de PI para los EA con epitopes ABO fueron mayores a 1. El cociente PI/ gramo de proteína permitió obtener valores representativos de la cantidad de epitopes presentes. La utilización de este método corroboró la presencia de epitopes ABO en los extractos y comparó la capacidad inhibitoria de diferentes extractos para estos epitopes.

**Palabras clave:** *Ascaris lumbricoides* \* sistema de grupo sanguíneo ABO \* capacidad inhibitoria \* difusión lumínica por partículas en suspensión

## Summary

**LIGHT DIFFRACTION OF SUSPENDED PARTICLES METHOD (LIGHT SCATTERING) APPLICABLE TO INHIBITORY CAPACITY IN RELATION TO ABO EPITHOPES IN ASCARIS LUMBRICOIDES**

Previous experiences have shown ABO epithopes presence in *Ascaris lumbricoides*. The aim of this work was to determine the inhibitory capacity of *A. lumbricoides* in relation to ABO epithopes by light diffraction of suspended particles method (Light Scattering). Eight parasite extracts (AE) from B Group patients and 4 AE from A Group patients (AE with and without ABO epithopes) were selected. The AE were faced against dilutions of monoclonal antibody (anti A or anti B). The exceeding antibody was neutralized with isogroup erythrocytes. The optical extinction of the agglutinates was measured. The agglutination percentage versus antibody dilution was graficated. Titre-50 (T-50) was calculated. Inhibitory Power (IP) was

---

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

defined as the relation between T-50 of the studied extract and T-50 of the control extract. The protein concentration of the AE was determined to express IP/ protein gram. IP values for the AE with ABO epitopes were greater than 1. The IP/ protein gram made it possible to obtain representative values of the ABO epitopes amount in each extract. The utilization of this method enabled corroboration of the ABO epitopes presence and comparison of the inhibitory capacity for these epitopes between different extracts.

**Keys words:** *Ascaris lumbricoides* \* ABO Blood Group System \* inhibition \* light scattering

## Introducción

Experiencias innovadoras han demostrado que *Schistosoma mansoni* puede adquirir antígenos de grupo sanguíneo sobre su superficie como una forma de mimetismo molecular (1) y que la adquisición de los antígenos ABH es realizada por un mecanismo pasivo (2). Muchos investigadores han asociado el Sistema ABO con parásitos humanos (1-3). En experiencias previas se ha demostrado la presencia de epitopes A y B en *Ascaris lumbricoides* (4) (5) por pruebas de inhibición de la aglutinación (6). La cuantificación precisa de las reacciones de hemaglutinación se realiza normalmente con autoanalizadores o contadores Coulter, aunque también se han descrito algunos métodos manuales de buena precisión para cuantificar estas reacciones (7) (8). Rasia RJ y cols desarrollaron un método manual de cuantificación de la hemaglutinación que aplica el fenómeno de difusión lumínica por partículas en suspensión (*Light Scattering*) (9) (10). La precisión de este método es similar a la de los métodos basados en el principio de sedimentación diferenciada de células libres y aglutinadas (7) (8), pero presenta la ventaja de ser más rápido y simple (9) (10).

El objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad inhibitoria de *A. lumbricoides* para epitopes ABO por cuantificación de la hemaglutinación aplicando el método de difusión lumínica.

## Materiales y Métodos

Se prepararon extractos parasitarios (EA) por remoción quirúrgica de la cutícula de ejemplares adultos y ruptura mecánica refrigerada (11). La presencia de epitopes del Sistema ABO en los extractos, se demostró utilizando técnicas inmunohematológicas convencionales (inhibición de la aglutinación) (6). Los resultados obtenidos con esta técnica permitieron seleccionar 8 extractos parasitarios provenientes de pacientes grupo sanguíneo B (EA 1, EA 2, EA 3, EA 4, EA 5 y EA 6 que presentaron epitopes B; EA 7 y EA 8 sin epitopes) y 4 extractos provenientes de pacientes grupo A (EA 9 y

EA 10 con epitopes A; y EA 11 y EA 12 sin presencia de epitopes).

La capacidad inhibitoria de los extractos fue evaluada por el método manual de cuantificación de la hemaglutinación que aplica el fenómeno de difusión lumínica por partículas en suspensión (9) (10). Inicialmente, cada extracto fue enfrentado a una serie de diluciones del anticuerpo monoclonal (1/1 hasta 1/1024) incubando 30 min a temperatura ambiente para que se produzca la reacción entre los epitopes ABO del extracto y el correspondiente anticuerpo. Para los extractos parasitarios con epitopes A el anticuerpo usado fue anti A monoclonal monoespecífico (Wiener, código 1443152, lote 004530) y para los extractos con epitopes B, anti B (Wiener, código 1443154, lote 404052). El anticuerpo excedente, no neutralizado por el extracto, se reveló utilizando una suspensión globular fresca de iso-grupo al 5%. Para cuantificar la aglutinación resultante se agregó a cada tubo un medio viscoso (glucosa 20% P/V en *buffer* salino fosfato, pH: 7,4) para mantener las partículas en suspensión (eritrocitos y aglutinados). Se midió la extinción óptica a 410 nm utilizando como testigo del 100% de células libres un tubo que contenía glucosa con suspensión eritrocitaria en ausencia de anticuerpo específico. Se graficó el porcentaje de aglutinación en función de la dilución del anticuerpo y se calculó el parámetro Título-50 (T-50), que es la dilución del anticuerpo que corresponde al 50% de aglutinación para cada extracto. El T-50 es un parámetro estimativo de la intensidad de la reacción y puede ser usado para comparar reacciones del mismo tipo (9) (10).

Los extractos estudiados se compararon con un extracto control (sin epitopes del Sistema ABO) proveniente de un paciente grupo sanguíneo O.

Se definió Poder Inhibitorio (PI) del extracto a la relación entre el T-50 del anticuerpo frente al extracto control y el T-50 del mismo anticuerpo frente al extracto estudiado.

$PI = \frac{\text{Título-50 del anticuerpo frente al EA control}}{\text{Título-50 del anticuerpo frente al EA estudiado}}$

A los efectos de poder comparar la capacidad inhibitoria de los extractos se estandarizaron los valores de

PI a la misma concentración de proteínas. Se determinó la concentración proteica de los extractos por un método colorimétrico automatizado (12).

## Resultados

Los resultados obtenidos con los 8 extractos provenientes de pacientes grupo B (6 EA de especificidad B y 2 EA sin epitopes B) y de los 4 extractos de pacientes grupo A (2 EA de especificidad A y 2 EA sin epitopes A) se muestran en la Tabla I.

Un valor de PI igual a 1 significa que los títulos del antisuero frente al EA control y frente al EA estudiado son iguales y por lo tanto el extracto en estudio carece de epitopes ABO.

Cuando el EA tiene epitopes ABO, neutraliza total o parcialmente el antisuero disminuyendo el título del mismo. En este caso los valores de PI son mayores a 1 y tanto más altos cuando mayor capacidad inhibitoria tenga el extracto analizado (mayor cantidad de epitopes ABO).

La Tabla I muestra que los 6 extractos estudiados de

pacientes grupo B y los 2 de pacientes grupo A, que habían evidenciado la presencia de epitopes ABO en el *test* de inhibición de la aglutinación, presentaron capacidad inhibitoria para estos epitopes tal como lo revelaron los valores de PI superiores a 1 (EA 1, EA 2, EA 3, EA 4, EA 5, EA 6, EA 9, y EA 10) mientras que los 4 EA (EA 7, EA 8, EA 11 y EA 12) sin epitopes ABO, carecieron de capacidad inhibitoria y sus valores de PI fueron iguales a 1.

Los valores de PI expresados por gramo de proteína de los extractos que presentaron capacidad inhibitoria (6 EA de especificidad B y 2 EA de especificidad A) se muestran en la Tabla II. La relación de los valores de PI con el contenido proteico del extracto permitió obtener valores representativos de la cantidad de epitopes ABO presentes. El EA 6 fue el de mayor valor de PI (PI = 22) pero cuando este valor se relacionó con el contenido proteico se observó que si bien presentaba una alta capacidad inhibitoria para epitopes ABO (PI/g de prot = 7,9) no era la de mayor valor. El EA 2 demostró tener el más alto poder inhibitorio expresado por gramo de proteína de todos los extractos estudiados (PI/g de prot = 13,8).

Tabla I. EA provenientes de pacientes de grupo sanguíneos A y B (con y sin epitopes ABO): Valores de T-50 del antisuero y capacidad inhibitoria de los extractos, expresada en valores de PI

EA de pacientes Grupo B	T-50 control (anti B)	Valor de T-50 con el extracto estudiado	PI del extracto estudiado
EA 1	22	14	1,57
EA 2	22	16	1,38
EA 3	22	16	1,38
EA 4	22	16	1,38
EA 5	22	14	1,57
EA 6	22	1	22
EA 7	22	22	1
EA 8	22	22	1
EA de pacientes Grupo A	T-50 control (anti A)	Valor de T-50 con el extracto estudiado	PI del extracto estudiado
EA 9	28	20	1,4
EA 10	28	14	2
EA 11	28	28	1
EA 12	28	28	1

Tabla II. Valores de PI expresado por gramo de proteína de los extractos que presentaron capacidad inhibitoria para epitopes ABO

EA	EA 1	EA 2	EA 3	EA 4	EA 5	EA 6	EA 7	EA 10
PI	1,57	1,38	1,38	1,38	1,57	22	1,4	2
Concentración proteica del EA (g / dL)	0,2	0,1	0,7	0,8	0,7	2,8	0,5	0,2
PI/g. proteína	7,9	13,8	2	1,7	2,2	7,9	2,8	10

## Discusión y Conclusiones

La presencia de antígenos de grupo sanguíneo en parásitos fue comunicada por varios autores (1) (3), aunque aún el significado clínico de este hecho es desconocido. Experiencias previas han demostrado que *A. lumbricoides* puede presentar los mismos epitopes del Sistema ABO (4) (5) y del Sistemar P (13) (14) que sus hospederos como una forma de mimetismo molecular. Con el objeto de tener una medida de la cantidad de epitopes presentes en el extracto, se cuantificó la reacción de hemaglutinación entre los anticuerpos monoclonales monoespecíficos excedentes y los eritrocitos de isogrupo después que el anticuerpo hubo reaccionado con el extracto parasitario. Esta técnica, que aplica el fenómeno de difusión lumínica por partículas en suspensión, ha sido utilizada para determinar la capacidad hemoaglutinante bacteriana (15) y también por su precisión, como método de referencia para analizar diferencias en la reactividad antigénica de los glóbulos rojos, para controlar reactivos inmunohematológicos, y para el dosaje ponderal de anticuerpos en pacientes inmunizados por comparación con un suero de referencia (9) (10).

El método aplicado permitió corroborar la presencia de epitopes ABO en extractos de *A. lumbricoides* y comparar la capacidad inhibitoria que presentan diferentes extractos para estos epitopes.

### CORRESPONDENCIA

PATRICIA PONCE DE LEÓN  
Laboratorio de Parasitología  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas  
Universidad Nacional de Rosario  
Suipacha 531  
2000 ROSARIO (Argentina)  
Tel.: 0341 4820037  
E-mail: tefu1958@hotmail.com

## Referencias bibliográficas

1. Thompson A. Molecular mimicry in schistosomes. *Trends Parasitol* 2001; 17 (4): 168.
2. Salzet A, Capron A, Stefano GB. Molecular crosstalk in host-parasite relationships. Schistosome- and Leech-host interactions. *Parasitol Today* 2000; 16: 536-40.
3. Morales G, Pino, L, Chourio-Lozano, G. Ecoepidemiología de *Ascaris lumbricoides* en una zona endémica y su relación con los grupos sanguíneos. *Acta Cient Venez* 1994; 45 (4): 287-91.
4. Ponce de León P, Valverde J, Zdero M. Preliminary studies on antigenic mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2000; 42: 295-6.
5. Ponce de León P, Valverde J. ABO System: molecular mimicry of *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45: 107-8.
6. Marcelli A, Fine JM, Ribat I. *Techniques in Immunohematologie*. Paris: Flammarion; 1981.
7. Dybkjaer EH. A new technique for the quantitation of hemagglutination. *Vox Sang* 1966; 11: 21-32.
8. Ropars C, Muller A, Hurel C, Leblanc J. A Manual semi-micro method for the quantitation of hemagglutination. *Blood Transfus Immunohematol* 1981; 24: 135-41.
9. Rasia RJ, García Rosasco M, Valverde de Rasia J. Método manual de Cuantificación de la Hemaglutinación aplicando difusión lumínica por partículas en suspensión (light scattering). *Rev Argent Transfus* 1986; 12: 71-7.
10. Rasia RJ, Valverde de Rasia J, García Rosasco M. Manual quantitative method for the study of red cell agglutination using light diffraction by suspended particles. *Vox Sang*. 1990; 58: 112-7.
11. Monroy Ostria A, Gómez Gutiérrez LJ, Ramírez-Ramírez A, Carrillo Laundin G. Reconocimiento por inmunotransferencia de antígenos de *Taenia solium* y su larva. *Rev Latinoam Microbiol* 1992; 34: 33-8.
12. Kachmar JF. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Munich: Saunders; 1970.
13. Ponce de León P, Valverde, J. P System epitopes in *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2002; 44: 115-6.
14. Ponce de León P, Valverde J. P System determiners expression in *Ascaris lumbricoides*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45: 53-4.
15. Fernández L, Balague C, Limansky A, Rasia RJ. Método cuantitativo aplicado a la capacidad hemoaglutinante bacteriana. *Acta Bioquím Clin Latinoam* 1994; 28 (3): 433-8.

Accepted for publication on 2 de septiembre de 2005